ünster i/W.1934.Nr 3/ Med Diss.

Aus der Hautklinik der Medizinischen Akademie Düsseldorf
(Direktor: Prof. H. Th. Schreus)

Über das Vorkommen von Spalthefen im Blut

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Würde eines doctor medicinae durch die Medizinische Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster in Gemeinschaft mit der Medizinischen Akademie in Düsseldorf

vorgelegt von

Louis Braconier
Oberhausen Rhld.

1 9 3 3

Druck der Buch- und Steindruckerei Gottl. D. Meyer, Libau.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Akademie in Düsseldorf und der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster.

Rektor der Medizinischen Akademie Düsseldorf: Manteufel.
Dekan der Medizinischen Fakultät Münster: von Szily.
I. Berichterstatter: Engelhardt.
II. Berichterstatter: Stühmer.

MEINEN ELTERN

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Das medizinische Schrifttum der letzten Jahre verdient besondere Aufmerksamkeit durch die von verschiedenen Seiten erhobenen Behauptungen bzw. geführten Nachweise, dass im Blute weitaus häufiger als man je geglaubt hat, Mikroorganismen nachweisbar sind. Ich erwähne ganz kurz die Tubercelbazillenbefunde Loewensteins und seiner Mitarbeiter, über deren gehäuftes Vorkommen bei den verschiedenen Tuberculoseformen und beim akuten Gelenkrheumatismus eine Einigung unter den Nachuntersuchern noch nicht erzielt ist. Neben den die Allgemeinmedizin interessierenden Befunden Loewensteins gaben die verschiedenen Arbeiten von Benedek, der die grosse Krankheitsgruppe des von Unna als seborrhoisches Ekzem genannten Krankheitsbildes durch einen von ihm gefundenen und genau beschriebenen Erreger hervorgerufen sehen will, Anlass zu einem lebhaften Meinungsaustausch auf verschiedenen Kongressen und einen Widerhall in anderen Fachdisziplinen, insbesondere in der Bakteriologie und pathologischen Anatomie. Eine Parallele mit den Loewenstein'schen Befunden findet sich insofern, als auch von Benedek behauptet wird, dass der Erreger, der von ihm als Spalthefe identifiziert worden ist, sich in einem grossen Prozentsatz im menschlichen Blut vorfindet und von hier aus — also von innen nach aussen — das Krankheitsbild des seborrhoischen Ekzems in seinen verschiedenen Variationen auf der äusseren Körperhaut hervorruft.

Die Untersuchungen Benedeks, die in einer grossen Anzahl von in- und ausländischen Arbeiten niedergelegt worden sind, machen eine Nachprüfung notwendig, zumal da die Theorie von der parasitären Entstehung des Eczema seborrh. Unna durch eine grosse Zahl von Tatsachen gestützt wird, und die Mehrzahl der Forscher sich auf den Standpunkt stellt, dass diese weitverbreitete Hauterkrankung tatsächlich durch einen bis jetzt unbekannten lebenden Erreger hervorgerufen wird.

Zu den von Benedek als beweisend für die ätiologische

Rolle der Spalthefe angeführten Punkten soll auf Grund der vorliegenden Arbeiten Stellung genommen werden und die Behauptung von dem Vorkommen der Spalthefe im menschlichen Blut einer eingehenden experimentellen Nachprüfung unterzogen werden. Es scheint dies umso notwendiger, als die Benedek'sche Lehre -- allerdings mit der nötigen Reserve den z. T. unbestätigten oder widersprechenden Untersuchungsergebnissen gegenüber — in allen neueren Lehr- und Handbüchern Aufnahme gefunden hat (z. B. „Die Fadenpilzerkrankungen des Menschen" von R. O. Stein, S. 108, „Grundriss der mykologischen Diagnostik" von Bruhns und Alexander S. 171). Stein schreibt als Schlussatz des Kapitels über die Schizosaccharomykose: „Die Arbeiten über die Nachprüfung der Benedek'schen Untersuchungen sind noch lange nicht abgeschlossen, und es wird noch viel Mühe und Arbeit notwendig sein, um festzustellen, ob die bei 27° auf 8 %-igem Glukoseagar wachsenden Spaltpilze tatsächlich der Erreger oder nur ein harmloser Nosoparasit des seborrhoischen Ekzems und der Schizosaccharomykide ist." Bruhns und Alexander schliessen ihr Kapitel mit dem Satz: „Benedek hat zweifellos das Verdienst, diese Spalthefe neu entdeckt und ausgiebig studiert zu haben. Über die ätiologische Rolle des Schizosaccharomyces hominis sind die Ansichten sehr geteilt, viele sehen in ihm nur einen Saprophyten, die Zeit muss die Klärung bringen." Für die Erregernatur der Spalthefe sprechen nach Benedek folgende nach seiner Ansicht von ihm erwiesenen Punkte:

1) Die Züchtbarkeit des Erregers aus den Effloreszenzen des seborrhoischen Ekzems in 100 %, wenn genügend oft und reichlich ausgesät und bei 27° bebrütet wird. Züchtung auf den von Benedek angegebenen Nährböden ist dabei Bedingung.

2) Die Übertragbarkeit der Affektion mittels Krankheitsprodukten von Mensch zu Mensch. Das Gleiche soll auch für die Reinkultur Geltung haben.

3) Die Möglichkeit des Nachweises von spezifischen humoralen Antikörpern.

4) Die Möglichkeit, mit Hilfe von Auto- oder Hetero-Vakzinen, hergestellt aus Spelthefestämmen, eine spezifische Gewebsallergie mit Hilfe von Intracutaninjektionen nachzuweisen.
5) Das positive Tierexperiment.
6) Der Nachweis des Erregers bei Mensch und Tier im histologischen Schnitt.
7) Die Züchtung des Erregers in situ aus Schüppchen und Haaren.
8) Die Möglichkeit der Züchtung aus menschlichem Blut bei Einhaltung gewisser Züchtungsbedingungen.
9) Die mikroskopische und kulturelle Darstellbarkeit des Parasiten in fast 100 % im Nabelschnurblut.
10) Die Nachweisbarkeit des Erregers in vegetativen Formen sowohl färberisch als auch kulturell im Inhalt von Canthariden-Blasen.

Die ersten Arbeiten Benedeks befassten sich mit einer ausführlichen Beschreibung des gefundenen und von ihm als Spalthefe bezeichneten Erregers. Hierzu wäre zu sagen, dass nach übereinstimmenden Untersuchungen von Doorepaal, Dittmann und Engelhardt das betreffende Bakterium keine Spalthefe ist, sondern ein dem Baz. megatherium de Dary identischer oder sehr nahe verwandter Sporenbildner, der sich in grossen Mengen in Wasser, Erde, Staub, Milch vorfindet. Diese Feststellung würde selbstverständlich an und für sich nichts an der Wichtigkeit der Benedek'schen Untersuchungen ändern, wenn die im vorstehenden angeführten wichtigsten Ergebnisse der Untersuchungen Benedeks sich bestätigen liessen.

Zu den einzelnen Versuchsergebnissen Benedeks soll im Folgenden auf Grund vorliegender Arbeiten Stellung genommen werden!

ad 1) Züchtbarkeit des Erregers in 100 %.

Von verschiedenen Untersuchern wurde der Nachweis der Spalthefe aus Schuppen versucht. Ihre Ergebnisse waren verschieden! Nicht gefunden werden konnte die Spalthefe von Bernstein, Buschke, Biberstein und Epstein, während Keil, Unna, Riecke, Reiss, Kadisch, Urbach, die Spalthefe aus seborrhoischen Erscheinungsformen der Haut in ver-

schieden hohen Prozentsätzen züchten können. Erwähnenswert ist, dass Kadisch, der bei seinen ersten Versuchen einen sehr hohen Prozentsatz an positiven Kulturen erhielt, bei späteren Züchtungen nur einen verschwindend kleinen Prozentsatz erhalten könnte Er führt die hohen Zahlen auf Verunreinigung seiner Laboratorien zurück. Von Engelhardt und Schneider stammen die ersten ausführlichen Nachprüfungen. Die Untersucher kommen zu dem Ergebnis, dass bei einmaliger Kulturaussaat in 12—14 % der Fälle Spalthefen im Sinne Benedeks gezüchtet werden können Bei wiederholten, bis zu zehnmaligen Züchtungsversuchen können bis 95 % positive Ergebnisse erzielt werden. In der Kritik ihrer Ergebnisse weisen die Untersucher aber auf die Verunreinigungsmöglichkeiten hin und führen den Nachweis, dass bei ihren Untersuchungen tatsächlich eine Laboratoriumsinfektion stattgefunden hat. In einer späteren Arbeit gibt Benedek den Prozentsatz der bei einmaligem Züchtungsversuch erhaltenen Spalthefe auf 10 — 15 % an. Der vorsichtige Schluss, dass die kulturellen Ergebnisse aus Schuppenmaterial nicht so eindeutig für die ätiologische Rolle der Spalthefe sprechen, ist nach den Ergebnissen der Nachuntersucher angebracht. Für seine eigenen Untersuchungen lehnt Benedek die Möglichkeit einer Verunreinigung ab.

ad 2) Die Übertragbarkeit der seb. Erkrankungen mittels Krankheitsprodukten von Mensch zu Mensch ist hin und wieder schon von anderen Untersuchern behauptet und experimentell nachgewiesen worden. (Jesionek, Winkler) Eine allgemeine Anerkennung hat sich diese Tatsache jedoch nicht erwerben können. In seiner ersten Publikation schreibt Benedek, dass die mit seiner Spalthefe vorgenommenen Impfungen an Menschen in 3 Fällen „auf den ersten Anhieb“ ein positives Ergebnis gezeitigt haben. Auch diese Behauptungen wurden von Engelhardt und Nikolai nachgeprüft. Die Untersucher kommen zu dem Schluss, dass es auf Grund von 277 an 155 Personen ausgeführten Impfungen mit Reinkultur der Benedek'schen Spalthefe nicht gelingt, ein dem seborrh. Ekzem gleiches oder ähnliches Krankheitsbild hervorzurufen. Ebensowenig wie Engelhardt und seine Mitarbeiter konnte Reiss (Schanghai) bei seinen Impfversuchen ein eindeutiges Ergebnis erhalten.

ad 3) und 4) Inokulationsversuche am Menschen und Züchtungsversuche aus Schuppenmaterial Seborrhoekranker sind jedoch — einerlei ob sie negativ oder positiv ausfallen — nicht geeignet, als Beweis für oder gegen die Erregernatur der Spalthefe angeführt zu werden. In dieser Erkenntnis weist Benedek in ausführlichen Arbeiten auf spezifische Veränderungen humoraler und histiogener Natur an seborrhoekranken Menschen hin und hält seine eindeutigen Versuche für ausschlaggebende Beweise für die Erregernatur der Spalthefe. Die immunbiologischen Versuche sind von Engelhardt und Geisler, Biberstein und Epstein und Bernstein nachgeprüft worden, ohne dass sie zu einem einwandfrei verwertbaren Ergebnis geführt hätten. Infolgedessen kommen die Untersucher zu dem Schluss, dass die von Benedek als Erreger des seborrh. Ekzems angeschuldigte Spalthefe nur als Noso-Parasit der menschlichen Haut in Frage kommt. In strengstem Gegensatz hierzu stehen jedoch die Untersuchungsergebnisse von Keil und Reinhard, die die Benedek'schen Untersuchungen weitgehend bestätigen.

ad 5), 6) und 7) Nachuntersuchungen der Ergebnisse Benedeks in Bezug auf das Tierexperiment, Nachweis des Erregers im histologischen Schnitt bei Mensch und Tier und Züchtung des Erregers in situ aus Schüppchen und Haaren liegen nicht vor. Es scheinen uns diese Punkte im Gesamtrahmen der Benedekschen Untersuchungsergebnisse auch weniger wichtig. Wichtiger scheinen uns die unter 8, 9 und 10 angeführten Behauptungen, die ganz neue Momente in den Fragenkomplex hineinwerfen.

Benedek behauptet mit grosser Bestimmtheit, dass bei Einhaltung gewisser Züchtungsbedingungen seine Spalthefe im Blute, Nabelschnurblut bzw. Cantharidenblaseninhalt in nahe zu 100% — kulturell oder färberisch- nachweisbar sei. Sollten sich diese Tatsachen bestätigen lassen, so wären damit einwandfrei Beweise für die aufsehenerregende Behauptung erbracht, dass die Spalthefe ein ständiger Parasit des Menschen ist.

Bevor ich auf den experimentellen Teil meiner Untersuchungen eingehe, soll kurz auf die Entwicklung der Technik der Züch-

tung der Spalthefe aus dem Blut und die Ergebnisse der Nachuntersucher eingegangen werden.

Blutkulturen hat Benedek schon in seinen ersten Arbeiten zu züchten versucht. Blutagargemische wurden in Platten oder Kölbchen gegossen oder Blutbouillon bei 27° und bei Zimmertemperatur bebrütet. Trotz 3 — 4-monatiger Beobachtung konnten Spalthefen nicht gezüchtet werden. Benedek ist es nur ein einziges Mal gelungen, aus kleinen Blutströpfchen, die durch Curretage aus einer seborrhoisch erkrankten Hautpartie der Achselhöhle gewonnen wurden, auf festen Nährböden Spalthefen zu züchten, von denen er annimmt, dass sie aus dem Blute stammen. Auf Grund seiner Erfahrungen verwendet er jedoch später nur flüssige Nährböden zur erstmaligen Züchtung der Spalthefe aus dem Blut und zwar die von ihm angegebene 5%-ige Glukosebouillon. Daneben werden noch 2%-ige Traubenzuckervenülen der Behringwerke zur Anzüchtung benutzt. Die Venülen dienten zur Kontrolle, um bezüglich der Herkunft der Spalthefeblutkulturen einen Zweifel auszuschliessen, da die beiden nebeneinander herlaufenden Methoden gleiche Ergebnisse brachten, wurde später auf die Verwendung von Traubenzuckervenülen verzichtet. Die Blutkulturen wurden nach 24 Stunden bis 4 Wochen positiv oder blieben auch nach einer Beobachtungszeit bis zu 4 Monaten steril. Es fällt auf, dass die Blutkulturen sich aus dem primären, flüssigen Nährboden auf festen 8%-igen Glukoseagar sehr häufig erst nach 3—8 Bouillongenerationen übertragen lassen. Dabei muss jedoch betont werden, dass die Spalthefe sich durch diese häufigen Umzüchtungen nicht als Verunreinigung einschleicht, sondern dass sie nach Benedeks Angaben schon in dem Primärröhrchen — also auch in der Venüle — im hängenden Tropfen mikroskopisch nachweisbar bezw. fortzüchtbar ist. Benedek betont, dass die Kulturen der „Blutspalthefen“ sich wesentlich von den „Hautspalthefen“ unterscheiden. Die ersteren sind kleine buckelige, lehmige, trockene, leicht abbröckelnde, gelblich- bräunliche, stecknadelkopf- bis linsengrosse Kolonien, während, die letzteren ein zerfliessendes, vielfach fadenziehendes, schleimiges, grauweisses Wachstum zeigen. Mit dieser Methode der „Anzüchtung“ der Primärkultur in flüssigem Nährboden gelingt es Benedek in 206 Fällen

36 mal eine Blutspalthefe zu züchten. Dabei muss betont werden, dass Benedek gegenüber diesem im Jahre 1922 gefundenen Prozentsatz positiver Blutspalthefekulturen von 17—18 % im Jahre 1928 einen Prozentsatz von 30 bei allen Formen der von ihm untersuchten Spalthefemykosen angibt.

Im weiteren Verlauf seiner Untersuchungen stellt Benedek jedoch einen hohen entwicklungshemmenden Einfluss des Blutes bezw. des Serum auf das Wachstum der Spalthefe fest und gibt infolgedessen im Jahre 1930 auf dem Internationalen Kongress in Kopenhagen eine Verbesserung seiner Methode an, die darin besteht, dass der wachstumshemmende Einfluss durch eine Citratlösung ausgeschaltet wird. Die durch scharfes Centrifugieren an der Grenze zwischen Serum und Blut entstehende Leukozytenschicht birgt nach Benedek den mikroskopisch leicht nachweisbaren Erreger, der bei dieser Art der Technik nicht nur in flüssigen, sondern sogar auf festen Nährböden anzüchtbar ist. Mit dieser Modifikation der Methode sollen in einem sehr hohen Prozentsatz Blutkulturen ohne Schwierigkeiten glücken.

Bewusst haben wir uns bei unseren Nachuntersuchungen nicht dieser letztangeführten Technik bedient, da uns das einstündige Centrifugieren des Blutes und die Zwischenschaltung der Citratlösung bei den Kulturversuchen eine allzu grosse Verunreinigungsmöglichkeit zu bieten schien. Eine Verwendung von Traubenzuckervenülen zu Kontrolizwecken wäre uns überdies bei der letztbeschriebenen Technik nicht möglich gewesen. Wir haben jedoch die Centrifugiermethode zur mikroskopischen Darstellung gegebenenfalls vorhandener Mikroorganismen im May-Grünwald-Giemsa Präparat angewandt.

Infolge des häufigen Wechsels in der Technik können die Versuche von Engelhardt und Schneider, durch Aufstreichen von Blut auf 8 %-Glukoseagar Spalthefekulturen zu züchten, nicht verwertet werden, da es ja mit dieser Technik auch nach Benedek nur in den seltensten Fällen gelingt, die Spalthefe zu züchten. Ohne Angabe seiner Technik gibt Scholz auf dem Dermatologenkongress in Königsberg an, dass es ihm nicht gelungen sei, Spalthefe aus Blut zu züchten. Auf dem gleichen Kongress teilt jedoch Urbach mit, dass er im Inhalt von Canthari-

denblasen über Pityriasis rosea-Effloreszenzen in 50 % seiner Fälle die Spalthefe züchten konnte. Es ist dies insofern hier von Bedeutung, als ja B. auf dem Standpunkt steht, dass die Züchtung aus Blaseninhalt gleichzusetzen ist einer aus dem Blut direkt gewonnenen Kultur. Keil bestätigt auf dem Internationalen Kongress in Kopenhagen die Ergebnisse Benedeks in vollem Masse. Es gelingt ihm unter 84 Patienten in 100 % die Spalthefe im Blut nachzuweisen und zwar beim ersten Kulturversuch.

Wir müssen also feststellen, dass von verschiedenen Seiten einander widersprechende Nachprüfungen der positiven Blutbefunde vorliegen. Zur Klärung der Widersprüche war es notwendig, in grösseren Versuchsreihen die Züchtung der Spalthefe aus Blut, Nabelschnurblut und Cantharidenblaseninhalt zu versuchen

Im Rahmen der Untersuchungen, die in der Düsseldorfer Hautklinik durchgeführt wurden, fiel mir die Aufgabe zu, zu untersuchen, ob überhaupt und in welchem Prozentsatz sich Spalthefe bei bestehender Pityriasis capitis sicca vorwiegend ohne andersartige Hauterkrankungen aus dem Blute züchten liess.

40 der von mir untersuchten Fälle litten an einer stark ausgeprägten Pityriasis capitis sicca ohne sonstige Hautveränderungen, 7 hatten ausserdem seborrhoische Veränderungen an der Körperhaut und 3 Kranke Erscheinungen einer Psoriasis. Es handelte sich in ungefähr gleichen Prozentsätzen um Personen beiderlei Geschlechtes zwischen 15 und 60 Jahren.

I. Nachweis durch die Kultur.

Um möglichst jeden Einwand auszuschliessen, wurde die Benedeksche Technik genau nach Vorschrift angewendet. Grösster Wert wurde auf steriles Arbeiten gelegt; es konnten daher auch nur in einem ganz verschwindend kleinen Prozentsatz Verunreinigungen, von denen später noch die Rede sein wird, beobachtet werden. Über die bei den Blutuntersuchungen angewendete Technik sei kurz folgendes berichtet:

Aus der Cubitalvene des vorher gut desinfizierten Armes wurden mit ausgekochter oder trocken sterilisierter 10 ccm-Spritze, die vorher mit 5 ccm einer von der Anstaltsapotheke bezogenen sterilen Citratlösung (Natr. citric. 0,6, Natr. chlorat. 0,9, Aqu. dest.

ad 100,0) gefüllt worden war, 5 ccm Venenblut aufgezogen. Dieses mit Citrat vermischte Blut wurde in ein steriles Centrifugenröhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde mit einem sterilen Wattepfropfen verschlossen und eine Stunde lang bei 3 – 4000 Umdrehungen zentrifugiert. Mit der gleichen Spritze wurde dann durch dieselbe Kanüle, die in der Vene verblieben war, 10 ccm Blut aufgezogen. Dieses Blut wurde auf 2 Kölbchen mit je 30 ccm einer 5 % Glukosebouillon in gleichen Mengen verteilt. Beim Centrifugieren ist auf sorgfältigen festen Sitz der Watte zu achten, da sonst durch die Centrifugalkraft der Pfropfen in das Röhrchon hineingepresst wird und der Versuch misslingt. Nach vorsichtigem Abgiessen des Serum wurden nun auf 2 – 3 Objektträger Leukozyten ausgestrichen von der Leukozytenschicht und möglichst sofort nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt.

Mit einer 30 ccm fassenden Traubenzuckervenüle der Behringwerke wurden dann durch neuerlichen Einstich ca 5 ccm Venenblut entnommen.

Die Bouillon, die in Mengen von je 2 Liter angefertigt wurde, hatte regelmässig eine Wasserstoffionenkonzentration von 6,8 bis 7,2, gemessen nach der Sterilisation im Dampftopf. Zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration wurde die Methode von Michaelis angewandt.

Zur kulturellen Untersuchung standen uns also jetzt zur Verfügung:

1) 2 Bouillonkölbchen mit je 5 ccm Blut in 30 ccm Glukosebouillon.

2) Die Traubenzuckervenüle mit ebenfalls 5 ccm Vollblut.

Nach kräftigem Umschütteln wurden diese 3 Röhrchen bezw. Kölbchen in dem Brutschrank bei 20 ° bebrütet. In den Röhrchen bilden sich gewöhnlich 3 Schichten:

a) ein flüssiges Blutbouillongemisch

b) Cruor

c) ein aus zelligen Elementen bestehender Bodensatz.

Die Übertragung von einem Röhrchen in das andere bezw. die mikroskopische Untersuchung wurde immer nach vorherigem kräftigem Umschütteln vorgenommen.

Bouillonkölbchen und Venüle wurden nach 48 Stunden herausgenommen und nach Umschütteln im hängenden Tropfen untersucht. In den Venülen wurden in keinem einzigen Falle

Spalthefen, auch keine verdächtigen Gebilde aufgefunden. Die Venülen blieben auch bei wiederholter Prüfung im hängenden Tropfen steril.

Im Anschluss an die Untersuchung im hängenden Tropfen wurde von dem Inhalt der Venüle ca 2 ccm in ein Röhrchen mit 30 ccm Glukosebouillon übertragen und wieder in den Brutschrank zurückgestellt (I. Passage). Diese erste Passage verblieb 8 Tage bei 27 ^{0} im Brutschrank und wurde dann nochmals im hängenden Tropfen mikroskopisch untersucht. Gleichzeitig wurde auf 8 $^0/_0$ Glukoseagar eine Anzüchtung versucht. Auch nach der ersten Passage verlief die Untersuchung im hängenden Tropfen in allen 50 Fällen negativ; ebenso blieben die Agarplatten während einer 10tägigen Beobachtungszeit ohne jedes Bakterienwachstum. Von der ersten Bouillonpassage wurde nun 2 ccm auf ein drittes Bouillonröhrchen überimpft (II. Passage). Diese Überführungen von einer Bouillonpassage in die andere mit gleichzeitigem Anzüchtungsversuch auf festem Nährboden (8 $^0/_0$ Glukoseagar) wurden bis zur fünften Passage durchgeführt, ohne je ein positives Ergebnis zu erhalten.

In der gleichen Versuchsordnung wurden auch die Kölbchen untersucht. Hier war der Befund bei den ersten 12 Fällen allerdings ein wesentlich anderer. In sämtlichen Kölbchen konnte ein sporenhaltiger Bazillus mit freien Sporen gezüchtet werden, dessen Identität mit der Spalthefe nach dem mikroskopischen Befund zweifelhaft war. Der Bazillus zeigte nach seiner Überimpfung auf 8 $^0/_0$ Glukoseagar weder nach der ersten noch nach der letzten Passage das geringste Zeichen von Wachstum Nur in einem einzigen Falle gelang die Anzüchtung des Bazillus auf festem Nährboden. Die erhaltene Kultur war jedoch weder makroskopisch noch mikroskopisch mit der Benedek'schen Spalthefe identisch.

Wie und woher kommt nun dieser Sporenbildner in unsere Kulturen? Es lag nahe, trotz steriler Arbeit an eine Verunreinigung zu denken. Wir nahmen daher Anlass, alle Verunreinigungsmöglichkeiten nochmals zu überprüfen.

Entweder stammt dieser Bazillus aus der Bouillon, aus der verwendeten Citratlösung oder aber aus dem Blute. Die Bouil-

lon wurde unter Beobachtung peinlichster Sterilität zubereitet und aufbewahrt. Ferner wurde zur Kontrolle jedesmal ein Bouillonleerversuch angestellt (acht Tage lange Bebrütung bei 27°, Überimpfung auf 8% Glukoseagar). Am 8. Tage wurde die Bouillon im hängenden Tropfen untersucht und nochmals auf Agar überimpft. Die Bouillon war bei der mikroskopischen Untersuchung stets steril und zeigte auch auf den Platten kein Wachstum. Die Citratlösung war steril aus der Anstaltsapotheke geliefert worden und erwies sich bei sofortiger Kontrolle durch Bouillonkulturen und das Plattenverfahren als steril. Ein anderes Ergebnis hatte jedoch eine später vorgenommene Untersuchung. Jetzt liess sich nämlich aus derselben Citratlösung ein Bazillus herauszüchten, der mit den in den Blutkulturen gefundenen identisch ist. Bei der Züchtung dieses Bazillus ging ich folgendermassen vor: zu einem Kölbchen mit 30 ccm Glukosebouillon gab ich 5 ccm der von der Anstaltsapotheke gelieferten Citratlösung. Nach ungefähr 2—3 Tagen zeigte sich auf dem Boden des Kölbchens eine leichte Trübung. Bei der Untersuchung im hängenden Tropfen fanden sich vereinzelte Stäbchen, die morphologisch den in den Blutkulturen gefundenen Bazillen glichen. Zur Sicherstellung ihrer Identität mit den aus den Bouillonkulturen und ihren Passagen gezüchteten Stäbchen, wurde das Bouilloncitratgemisch nach 3 Tagen in einem sterilen Röhrchen centrifugiert und das Sediment nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. In diesen Präparaten fanden sich rot und blassblau gefärbte Stäbchen, die sowohl in Form als auch in Farbe mit den in den Blutausstrichen gefundenen Stäbchen übereinstimmten. Die gleichzeitig angelegte 8% Glukoseagarkultur ergab ohne Schwierigkeiten ein üppiges Wachstum. Die Kultur war identisch mit dem Sporenbildner unserer Blutkulturen. Damit war die Citratlösung als Quelle der Verunreinigung herausgefunden. Die verschiedenen Ergebnisse zwischen den beiden Züchtversuchen erklären wir uns so, dass wir annehmen, dass der erste Kulturversuch entweder wegen der geringen Anzahl der Keime oder wegen der durch den Sterilisationsprozess bedingten Wachstumshemmung steril blieb. Bei der hohen Widerstandsfähigkeit der Sporenbildner ist die letzte Annahme wahrscheinlich, zumal da nach

Benedek (briefliche Mitteilung) die Citratlösung nur 30' im Dampftopf gekocht werden darf.

Von jetzt an wurde die Citratlösung unter Verwendung redestilierten Wassers selbst angefertigt. Ausserdem wurde die Citratlösung nicht mehr in die Spritze aufgezogen, sondern in einer Menge von 5 ccm in ein Centrifugenröhrchen gegeben und so sterilisiert. Die Methodik war also folgende: Mit einer 10 ccm Spritze wird Blut aufgezogen und zu gleichen Teilen in zwei Bouillonkölbchen mit je 30 ccm Glukosebouillon gegeben. Dieses Blut kam also mit der Citratlösung überhaupt nicht mehr in Berührung. Das zur mikroskopischen Untersuchung bestimmte Blut wurde mit einer 5 ccm Spritze entnommen und in das mit 5 ccm Citrat gefüllte Centrifugenröhrchen gegeben. Damit kam eine Fehlerquelle in Wegfall, die darin lag, dass dieselbe Spritze und dieselbe Kanüle, die zum Aufziehen der Citratlösung benutzt worden war, auch zum Aufziehen des für die Bouillonkölbchen bestimmten Blutes gebraucht worden war. Die Feststellung, die ich dann bei den weiteren Versuchen machte, war ebenso überraschend als interessant, denn in keinem einzigen der folgenden 38 Fälle zeigte sich weder makroskopisch noch mikroskopisch irgendetwas Verdächtiges. Die Kölbchen blieben ebenso wie die 5 Passagen und die immer wieder zur „Anzüchtung" versuchten 8 % Glukoseagarkulturen steril, mit Ausnahme von 2 Röhrchen, die nach der ersten Passage verschimmelten und deshalb aus der Versuchsreihe ausgeschaltet wurden. Während wir also nach Ausschaltung der Citratlösung als etwaige Verunreinigungsquelle bei den Züchtversuchen der Spalthefe aus menschlichem Blut in 100 % einwandfrei negative Ergebnisse erhielten, machte uns die Deutung der mikroskopischen Leukozytenausstrichpräparate Schwierigkeiten.

II. Nachweis im mikroskopischen Präparat.

(Leukozytenschicht).

Bei der Anfertigung der nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Ausstrichpräparate wurden die Benedek'schen Vorschriften streng eingehalten. Trotzdem wurden in ca 20 % der Fälle relativ wenig Leukozyten, in einigen Fällen sogar nur Erythro-

zyten erhalten. Da sich jedoch auch in den uns von Benedek zugeschickten Testpräparaten teilweise ausschliesslich Erythrozyten vorfanden, und trotzdem „Spalthefen" in reichlichster Menge dargestellt waren, so legten wir diesem Befund kein besonderes Gewicht bei.

In den uns von Benedek überlassenen Kontrollpräparaten fanden sich „Spalthefen" in grosser Menge als blaugefärbte Bazillen, die, in Diploform gelagert, keine Andeutung von Sporenbildung erkennen liessen, im Gegensatz zu den aus Cantharidenblaseninhalt gewonnenen Präparaten, in denen die Spalthefen sporenhaltig waren. Auch sonst waren gewisse Unterschiede der Spalthefe in Form und Färbung zwischen den aus Blut und den aus Cantharidenblasen gewonnenen Ausstrichen vorhanden. So waren die Bazillen in ersteren scharf begrenzt und zeigten eine tiefblaue Farbe, während sie in den letzteren nicht ganz so scharf begrenzt waren und auch in ihrer Farbe schon mehr stahlblau bis hellblau erschienen.

Von jedem der 50 kulturell untersuchten Fälle wurden gleichzeitig Leukozytenausstrichpräparate nach der Benedek'schen Vorschrift angefertigt. 2—3 Objektträger wurden nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt und ausser von mir noch von 2 anderen Untersuchern eingehend auf das Vorkommen von bakteriellen Elementen untersucht Bei der Vielgestaltigkeit der Spalthefe war es sehr wichtig, nicht nur ausgesprochene Stäbchen, sondern auch alle anderen an die Spalthefe auch nur erinnernden Gebilde zu beachten. So kam es, dass in grösserem Prozentsatz Gebilde gefunden wurden, deren Einordnung in eine Bakteriengruppe nicht ohne weiteres möglich war. Ein Teil unserer Befunde, insbesondere bei den ersten 12 Fällen, ist sicher durch die Verunreinigung der Citratlösung zu erklären, während eine andere Fehlerquelle gesucht werden muss in der Möglichkeit des Aufliegens von Luftkeimen auf die Blutausstriche in der Zeit, die zwischen Blutuntersuchung und Färbung liegt. Um dem Nachuntersucher ein genaues Bild zu geben, haben wir alle verdächtigen Befunde in einer Tabelle zusammengestellt, die auf der nächten Seite folgt.

Fall №	Mikroskopischer Befund	Diagnose	Kultur
1	3 verdächtige Stäbchen in Diploform		
2	Vereinzelte blaurote Stäbchen		
3	2 verdächtige Stäbchen	Pityriasis capitis sicca	
5	Kleine, blau oder rot sich färbende Diplokokken von Gonokokkengrösse, unsichere rote und verdächtige blaue Stäbchen		Sporenhaltiger Baz.
6	Blaue spindelförmige Gebilde mit Aussparungen, die Sporen entsprechen	Seb. Ekzem	wie in der Citratkontrolle
7	Vereinzelte blaue Stäbchen	„	
8	Wie 6, jedoch abgerundet mit 2 Aussparungen	Pit. cap. sicca	
10	Wie Fall 8	Seborrh Ekzem	
12	Sehr verdächtige blaue Stäbchen	„	
16	Formen, wie bei 6, 8, 10, dazu Fäden mit dichotomischer Verzweigung	„	
17	Staphylokokken	Pit. cap. sicca	
29	Verdächtige blaue Stäbchen	„	
35	Blaue verdächtige Stäbchen	Seborrh. Ekzem	steril
44	Dicke, blaue, rundovale Formen	Psoriasis vulg.	
45	Ein Diplokokkenhäufchen	„	
47	Wie bei 44	„	
49	Einige schwarzblaue verdächtige Stäbchen	Seborrh. Ekzem	

Eine einwandfreie Identifizierung der in unserem Präparat gefundenen Keime mit denen der uns zur Verfügung gestellten Testpräparates war nicht möglich. Einer strengen Kritik hat kein Bakterienbefund standgehalten. Wir stellen daher fest, dass auch in der Leukozytenschicht mit Hilfe der May-Grünwald-Giemsa Färbung Spalthefen, bzw. Bakterien, die einwandfrei aus dem Blute stammen, nicht nachgewiesen werden können.

Zusammenfassung.

Die Behauptung Benedeks, dass Spalthefen in einem hohen Prozentsatz im menschlichen Vollblut nachweisbar sind, wurde an 50 Fällen eingehend nachgeprüft. Es gelingt in keinem einzigen Falle, weder kulturell noch mikroskopisch, das Vorhandensein von Spalthefen im Blut zu bestätigen. Die vorgefundenen Gebilde in den Leukozytenausstrichen sind entweder bedingt durch Verunreinigungen der verwandten Citratlösung oder durch aus der Luft auf die Blutausstrichpräparate geflogene Keime. Die verdächtigen bzw. zweifelhaften Befunde müssen infolgedessen als durch die Technik bedingte Verunreinigungen aufgefasst werden.

Schriftennachweis.

Arbeiten über „Spalthefe" siehe bei

Benedek: Bericht VIIIe. Congres international de Dermatologie et de Syphiligraphie, Kopenhagen; ausserdem
Bernstein: Dermat. Z. 59, 1930.
Dittmann: Dermat. W 93, 1931, H. 50.
Doorepaal: Centr. f. Bakt. II. Abt. 82.

Lebenslauf.

Ich, Louis Braconier wurde am 22. März 1906 in Oberhausen als Sohn des Ingenieurs Eugen Braconier und seiner Ehefrau Gertrud, geborene Leven, geboren. Das Abiturium machte ich am Realgymnasium 1926 zu Oberhausen. Mein medizinisches Studium begann ich im selben Jahre in Bonn. Daselbst bestand ich nach 5 Semestern das medizinische Vorexamen. Darauf begab ich mich nach Düsseldorf, wo ich meine klinischen Semester verbrachte. Mein ärztliches Staatsexamen bestand ich am 11. Juni 1932 an der Medizinischen Akademie zu Düsseldorf.